Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Düsseldorf

Prof. Dr. med. F. K. Ohnesorge

Ein Radioimmunoassay für Metallothionein

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Thomas Schack

Düsseldorf

1984

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Düsseldorf

Prof. Dr. med. F. K. Ohnesorge

Ein Radioimmunoassay für Metallothionein

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Thomas Schack

Düsseldorf

1984

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.: Prof.Dr.Hopf

Referent
gez.: Prof.Dr.Ohnesorge
gez.: Prof.Dr.Schlipköter

Meiner Mutter, meinem Vater
meinen Brüdern Christoph und Andreas
meiner lieben Germaine

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung und Fragestellung	2
1.1.	Einleitung	2
1.1.1.	Metallothionein	2
1.1.1.1.	Definition von Metallothionein	2
1.1.1.2.	Physiologische Bedeutung von Metallothionein	2
1.1.2.	Die Bedeutung von Cadmium in der Humantoxikologie	4
1.1.2.1.	Vorkommen von Cadmium in der Umwelt	4
1.1.2.2.	Exposition des Menschen mit Cadmium	5
1.1.2.3.	Resorption und Verteilung von Cadmium	5
1.1.2.4.	Akute und chronische Toxizität von Cadmium	6
1.2.	Fragestellung	7
2.	Material und Methoden	8
2.1.	Material	8
2.1.1.	Chemikalien	8
2.1.2.	Lösungen	9
2.1.3.	Tiermaterial	10
2.1.4.	Geräte	10
2.2.	Methoden	11
2.2.1.	Gewinnung des Ziegenantikörpers	11
2.2.1.1.	Immunisierung der Ziegen mit Metallothionein	11
2.2.1.2.	Blutentnahme und Gewinnung von Ziegenserum	11
2.2.1.3.	Nachweis von Antikörper gegen Metallothionein mit Hilfe des Immundiffusionstests nach Ouchterlony	13
2.2.2.	Radiomarkierung von Metallothionein mit dem Bolton-Hunter-Reagenz	14
2.2.3.	Durchführung des Radioimmunoassay für Metallothionein	15
2.2.3.1.	Vorversuche zum Radioimmunoassay	15
2.2.3.1.1.	Stabilität von ^{125}J-Mt im Testsystem	15
2.2.3.1.2.	Bestimmung der Antigenbindungskapazität des Ziegenserums	16
2.2.3.1.3.	Titration des Kaninchenserums	16
2.2.3.1.4.	Ermittlung der ABC-33	17

		Seite
2.2.3.2.	Erstellung einer Standard-Eichkurve zur Bestimmung von Metallothionein	17
2.2.4.	Erprobung des Radioimmunoassay durch Metallothionein-Messungen im Urin	18
2.2.4.1.	Auswirkung des Urins auf die Eichkurve	18
2.2.4.2.	Metallothionein-Messung im Urin	19
3.	Ergebnisse	20
3.1.	Gewinnung des Ziegenantikörpers	20
3.2.	Radiomarkierung von Metallothionein mit dem Bolton-Hunter-Reagenz	20
3.3.	Durchführung des Radioimmunoassay für Metallothionein	24
3.3.1.	Stabilität von ^{125}J-Mt im Testsystem	24
3.3.2.	Bestimmung der Antigenbindungskapazität des Ziegenserums	26
3.3.3.	Titration des Kaninchenserums	26
3.3.4.	Ermittlung der ABC-33	29
3.3.5.	Erstellung einer Standard-Eichkurve zur Bestimmung von Metallothionein	30
3.4.	Erprobung des Radioimmunoassay durch Metallothionein-Messungen im Urin	30
3.4.1.	Auswirkung des Urins auf die Eichkurve	30
3.4.2.	Metallothionein-Messung im Urin	34
4.	Diskussion	36
4.1.	Gewinnung des Ziegenantikörpers gegen Metallothionein	36
4.2.	Markierung von Metallothionein mit ^{125}J	36
4.3.	Meßbereich des Radioimmunoassay	37
4.4.	Bestimmung von Metallothionein im Urin	38
5.	Zusammenfassung	39
6.	Literaturverzeichnis	40

Abkürzungen

ABC	Antigenbindungskapazität
ABC-33	Serumverdünnung, bei der 33 % des Tracerantigens an den Antikörper gebunden wird.
AG	Antigen
AK	Antikörper
BBS	Natriumboratpuffer
^{125}J-Mt	Radiojodmarkiertes Metallothionein
Mt	Metallothionein
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
PBS	Natriumphosphatpuffer
RIA	Radioimmunoassay

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Einleitung

1.1.1. Metallothionein (Mt)

1.1.1.1. Definition von Metallothionein

1957 isolierten Margoshes und Vallee aus Pferdenieren ein metallhaltiges Protein, das nach weiteren Untersuchungen von Kägi und Vallee 1960 wegen seines großen Gehalts an Metallen und Schwefel als Metallothionein bezeichnet wurde.

Metallothioneine sind niedermolekulare Proteine, deren Existenz in allen bisher untersuchten eukaryonten Zellen nachgewiesen wurde (Webb, 1979). Die Molekulargewichte betragen 6000 - 8000 Dalton. Die Proteinketten setzen sich aus 60 - 70 Aminosäuren zusammen.

Metallothioneine beinhalten keine aromatischen Aminosäuren, ebensowenig ist Histidin und Arginin am Proteinaufbau beteiligt. Die Proteinsequenz zeigt neben einem hohen Serinanteil (16 %) bis zu 30 % Cystein. Die Aminosäuresequenz der aus verschiedenen Säugetierspezies isolierten Formen zeigt eine große Ähnlichkeit (Kägi und Vallee, 1960, 1961; Kägi und Mitarbeiter, 1979).

Als gebundene Metalle wurden bisher Cadmium, Zink, Kupfer, Quecksilber, Silber, Gold und Wismut identifiziert (Cherian und Goyer, 1978).

Der prozentuale Anteil der an Metallothionein gebundenen Metalle ist unterschiedlich. Es wird daher je nach Dominanz der Metalle z.B. zwischen Cd-, Zn- oder Cu-Metallothionein unterschieden.

1.1.1.2. Physiologische Bedeutung von Metallothionein

Im Organismus sind Mts in der cytosolischen Fraktion von parenchymatösen Organen vorhanden. In unbehandelten Tieren nehmen die Konzentrationen in den Organen in folgender Reihenfolge ab: Pankreas, Hoden, Leber, Nieren. Metallothionein kann aber auch im Gehirn und in der Herzmuskulatur nachgewiesen werden (Abel, persönliche Mitteilung).

Die Konzentrationen reichen von ca 500 µg/g in der Schweineleber bis ca 7 µg/g in der Muskulatur von Kaninchen (Zelazowski und Piotrowski, 1977).

Besonders hohe Konzentrationen von Mt werden in prenatalen Geweben gefunden, insbesondere in der Leber, wo der Mt-Gehalt vor der Geburt stark ansteigt. Nach der Geburt nimmt der Mt-Gehalt ab und erreicht ca 14 Tage post partum den Gehalt erwachsener Tiere (Bakka und Webb, 1981).

In den meisten bisher untersuchten Tierspezies läßt sich nach den herkömmlichen chromatographischen Methoden Metallothionein in Form zweier Isothioneine isolieren. Mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie konnten bei Kaninchen neuerdings 6 verschiedene Isoformen in der Leber nachgewiesen werden (Kägi und Mitarbeiter, 1983).

Die biologische Funktion des Proteins ist noch unklar. Es wird vermutet, daß Mt in die zelluläre Regulation der Zink- und Kupferhomöostase involviert ist, wobei es sowohl die zelluläre Aufnahme, als auch die Abgabe dieser Spurenelemente auf zellulärer Ebene regulieren soll (Cousins, 1979).

Richard und Cousins (1975) beschrieben ein Modell, in dem Mt die intestinale Zn-Resorption reguliert. In diesem Modell wird eine exzessive Aufnahme von Zink in den Organismus durch eine Induktion der Mt-Synthese in der Darmmukosa und anschließender Bindung des Metalls an Mt verhindert. Diese Hypothese wurde von einigen Autoren unterstützt (Menard und Mitarbeiter, 1981), von anderen jedoch infrage gestellt (Sugawara, 1982; Kello und Mitarbeiter, 1979).

Eine weitere Hypothese über die biologische Funktion von Mt besagt, daß es sich dabei um eine Art Speicherprotein für essentielle Spurenelemente handelt, das bei Bedarf Metalle an andere zelluläre Komponenten abgibt, die, falls es sich dabei um Vorstufen von Enzymen handelt, zum Holoenzym komplettiert werden (Udom und Brady, 1980).

Die Tatsache, daß durch Metalle wie Cadmium, Zink, Kupfer und Quecksilber die Synthese von Metallothionein beschleunigt wird, ließ auf eine Entgiftungsfunktion dieser Proteine gegenüber toxischen Schwermetallen schliessen (Piscator, 1964; Nordberg, 1972).

UNIV. LEIDEN NEL.

Bereits eine Stunde nach intraperitonealer Applikation von Cadmium kann nachgewiesen werden, daß etwa 5 % der applizierten Dosis an Mt gebunden sind. Diese Bindung nimmt mit der Dauer der Exposition zu. In Leber und Nieren sind bis zu 80 % der gesamten Cadmiummenge an Metallothionein gebunden. Es wird vermutet, daß Mt das in die Zelle eindringende Cd komplexiert und somit andere sensitive Makromoleküle vor Cadmium schützt (Webb, 1972b).

Nach Nordberg (1975a) spielt das Mt eine paradoxe Rolle in der Pathogenese der Cadmiumvergiftungen. Es hat sich gezeigt, daß intravenös appliziertes Cd-Mt extrem nierentoxisch ist. Die nephrotoxische Wirkung von Cd-Mt ist 8 - 10fach stärker, als diejenige einer gleichen Menge ionischen Cadmiums. $CdCl_2$ hingegen besitzt eine stärkere hepatotoxische Wirkung (Nordberg, 1978).

1.1.2. Die Bedeutung von Cadmium in der Humantoxikologie

1.1.2.1. Vorkommen von Cadmium in der Umwelt

Cadmium kommt in der Natur vorwiegend als Cadmiumblende, Cadmiumcarbonat und Cadmiumoxid vor. In unbelasteten Gebieten sind in der Erdkruste nur Spuren von Cadmium vorhanden. So liegt die Konzentration von Cadmium in der Bodenkrume unter 1 µg/g (Babich und Stotzky, 1978; Fleischer und Mitarbeiter, 1974).

Erhöhte Emissionen und zunehmende industrielle Nutzung von Cadmium als Pigmentfarbstoff, Stabilisator in Kunststoffen, Kathodenmaterial in Batterien oder Galvanisierungsmitteln führten zu einer Umverteilung und Anreicherung von Cadmium in unserer Umwelt (Babich und Stotzky, 1978). Nach der BMI-Anhörung zu Cd (E1-23, 1982) beträgt der Emissions-Massenstrom in der Bundesrepublik Deutschland insgesamt 32,5 t/a, davon knapp 50 % aus Feuerungsanlagen.

Nach dem UBA-Bericht 1981 (s. BMI-Anhörung E2-1) wird die Cadmium-Emission aus Eisen-, Stahl- und NE-Verhüttung mit rund 50 t/a oder 56 % der Gesamtemission von Cd angegeben.

1.1.2.2. Exposition des Menschen mit Cadmium

Cadmium wird vom Menschen mit der Nahrung, dem Trinkwasser und der Atemluft aufgenommen, wobei die orale Belastung über die Nahrungsmittel die Hauptkontaminationsquelle darstellt.

Nach neuesten Angaben von Diehl (1981) stammen ca 25 % der Gesamtzufuhr an Cadmium von Lebensmitteln tierischer Herkunft. Unter den Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft macht der Verzehr von Getreide oder Getreideprodukten 27 %, von Kartoffeln 23 % und Obst 5,5 - 21 % der Gesamtzufuhr von Cadmium aus (EPA, 1981).

Die täglich zugeführte Gesamtmenge an Cadmium über Lebensmittel und Getränke (Trinkwasser) wird mit 20 - 30 µg angegeben (Ohnesorge, 1983).

Die Belastung über die Luft spielt gemessen an der Gesamtzufuhr nur eine untergeordnete Rolle. Nach Angaben von Ohnesorge (1983) beträgt die mittlere inhalative Zufuhr in Nordrhein-Westfalen täglich 50 - 80 ng. Allerdings kann der Genuß von Tabak zu einer wesentlichen Erhöhung der Gesamtzufuhr an Cadmium beitragen.
Die inhalative Cadmiummenge wird auf 100 - 200 ng/Zigarette geschätzt.

1.1.2.3. Resorption und Verteilung von Cadmium

Nur ein geringer Teil des oral aufgenommenen Cadmiums wird enteral resorbiert. Beim Menschen wird die Resorptionsrate mit 4,7 %, von einigen Autoren allerdings bis maximal 25 % der oral aufgenommenen Menge angegeben (Ohnesorge, 1983).
Der Rest wird mit den Faeces eliminiert. Die Resorptionsrate kann durch eine Reihe endogener und exogener Faktoren beeinflußt werden. Ein niedriger Vitamin C- oder Kalziumgehalt steigert die resorbierte Cadmiummenge, während eine proteinreiche Diät die Resorption von Cadmium vermindert (Friberg und Mitarbeiter, 1974).

Im Gegensatz zur oralen Belastung ist die resorbierte Cadmiummenge bei inhalativer Belastung wesentlich höher und abhängig von der Partikelgröße, Löslichkeit der Cadmiumverbindungen, sowie vom Funktionszustand der Lunge. Aerosolpartikel mit einer Teilchengröße unter 2 µm werden fast vollständig in der Lunge deponiert und resorbiert. Größere Partikel lagern sich in den

oberen Atemwegen ab und werden meist durch den mukoziliären Transportmechanismus in den Rachenraum transportiert.

Bei Rauchern kann bei Konsum von 20 Zigaretten die inhalativ resorbierte Menge bis zu 2 µg/Tag betragen, wodurch sich im Verlauf von 40 Jahren eine Gesamtmenge von bis zu 15 mg Cadmium im Körper anreichern kann (UBA, 1977).

Resorbiertes Cadmium wird unabhängig vom Aufnahmemechanismus mit dem Blut auf alle Organe verteilt, reichert sich aber vorwiegend in Leber und Niere an.
Die Leber als primäres Speicherorgan reichert bei subakuten bis subchronischen Belastungen ca 50 % der resorbierten Menge an. Erst mit zunehmender Dauer der Exposition wird Cadmium auch in größeren Mengen in den Nieren gespeichert (Nordberg, 1976).

Da die Elimination von Cadmium äußerst gering ist - die biologische Halbwertzeit beim Menschen wird mit 15 - 30 Jahren angegeben - reichert sich Cadmium im Verlauf des Lebens nahezu linear in den Organen an (Friberg, 1974).

Der größte Teil der angereicherten Cadmiummenge ist dabei an Metallothionein gebunden.

1.1.2.4. Akute und chronische Toxizität von Cadmium

Bei akuten Vergiftungen stehen lokale Reizerscheinungen im Vordergrund.
Nach oraler Aufnahme größerer Cadmiummengen tritt eine Gastroenteritis mit Übelkeit, Erbrechen und Durchfall auf (Nordberg, 1976).
Inhalative Vergiftungen führen zu Tracheitis, Bronchitis und in schlimmen Fällen bis zum letal verlaufenden Lungenödem (Buell, 1975).
Nach parenteraler Applikation tritt im Tierexperiment eine schwere Schädigung der Gonaden auf, die als Folge extremer Kapillarschädigung angesehen wird (Nordberg, 1971).

Bei chronischen Belastungen treten Nephropathien auf, die im Sinne eines Fanconi-Syndroms mit einer Proteinurie, Aminoazidurie, Enzymurie und Glucosurie einhergehen (Buell, 1975; Nordberg, 1976; Piscator, 1976). Daneben wurden Osteomalazien beschrieben, die in Japan im Zusammenhang mit der Itai-Itai-Krankheit auftraten und auf eine regional begrenzte chronische Cadmiumvergiftung zurückgeführt wurden (Nogawa, 1975; Tsuchiya, 1976b).

1.2. Fragestellung

Nach den gegenwärtigen Erkenntnissen ist Metallothionein ein wichtiges Grundelement im Stoffwechsel essentieller Spurenelemente.

Aus toxikologischer Sicht steht die extreme Nephrotoxizität des Cadmiummetallothioneins im Vordergrund. Eine Klärung der pathophysiologischen Zusammenhänge zwischen Cd-Mt und den nach chronischen Cd-Expositionen beobachteten Nierenschädigungen erlaubt eine bessere Beurteilung und Abschätzung des Risikos der Allgemeinbevölkerung.

Dazu ist es zunächst nötig, dieses Protein mit geeigneten und sensitiven Methoden zu erfassen. Die bisher angewandten Methoden sind teils sehr zeitaufwendig, oder durch eine mangelnde Sensitivität und Spezifizität belastet.

In dieser Arbeit wird ein radioimmunologisches Nachweisverfahren für Metallothionein beschrieben und seine Anwendbarkeit mit biologischem Material getestet.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Barbital-Natrium	:	5,5-Diethylbarbitursäure ($C_8H_{11}N_2NaO_3$), M = 206,18 g/mol, Art. 6318 Merck
Di-Natrium-tetra-Borat	:	($Na_2B_4O_7$), M = 201,22 g/mol, Art. 6306 Merck
Natriumchlorid krist.	:	(NaCl), M = 58,44 g/mol, Art. 6404 Merck
Natriumhydrogenphosphat-1-hydrat	:	prim. Natriumphosphat, ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$), M = 137,99 g/mol, Art. 6346 Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat	:	sek. Natriumphosphat ($na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$), M = 177,99 g/mol, Art. 6580 Merck
Gelatine	:	pH = 5,4; Nr. 22151 Serva
Glycin	:	Glycocoll (H_2NCH_2COOH), M = 75,07 g/mol, Art. 4201 Merck
Agarose L	:	für Geldiffusion und Gelelektrophorese-techniken Behringwerke AG, Marburg
Benzol	:	(C_6H_6), M = 78,11 g/mol, Art. 1779 Merck
Albumin aus Rinderserum	:	lyophil. rein, 92 % min., M = 65000 g/mol, Serva
Natriumazid	:	(NaN_3), M = 65,01 g/mol, Art. 6688 Merck
Sephadex G-25	:	Fine Chemicals, Pharmacia
Kaliumjodid	:	(KJ), M = 166,01 g/mol, Art. 5043 Merck
Äthanol abs.	:	(C_2H_5OH) Merck
Triton X-100	:	Serva, Heidelberg
Kaninchen-anti-Ziegen Gamma-Globulin	:	Behringwerke AG, Marburg
Natriumhydroxid	:	(NaOH), M = 4000 g/mol, Art. 6498 Merck
Borsäure	:	(H_3BO_3), M = 61,8 g/mol, Art. 15165 Serva

Aceton p.A. : (CH_3COCH_3), Art. 14 Merck

Freundsches Adjuvans : Difco Lab. Detroit, Michigan, USA

PMSF : (Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid)
P 7626 Sigma

2.1.2. Lösungen

Coomassie brilliant blue R 250 (Colab.Laboratories Inc. Chicago Heights, II) : 0,1 % Farbstoff in einer Lösung bestehend aus: 10 % Eisessig, 45 % Äthanol abs., 45 % Aqua dest.
Entfärber: 10 % Eisessig, 25 % Äthanol abs., 65 % Aqua dest.

Puffer : Boratpuffer 0,1 M, ph = 8,5 :

Borsäure	6,184 g
$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	9,536 g
NaCl	4,384 g

auf 1 l Aqua dest.Titration auf pH 8,5 mit HCl oder NaOH

: Natriumboratpuffer (BBS) :
5 Teile Boratpuffer auf 95 Teile NaCl 0,9 %

: Natriumphosphatpuffer (PBS) :
0,01 M, pH = 7,2

A) $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	1,38 g
NaCl	8,50 g

auf 1 l Aqua dest.

B) $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	1,77 g
NaCl	8,50 g

auf 1 l Aqua dest.

280 ml der Lösung 1 mit 720 ml der Lösung B vermischen und auf pH 7,2 titrieren

: Natriumphosphat-Gelatine-Puffer :
0,05 M Natriumphosphatpufffer mit 0,25 % Gelatine vermischen, filtrieren
(2 l Puffer mit 5 g Gelatine)

Bolton-Hunter-Reagenz : N-Succinimidyl 3-(4-hydroxy, 5-(^{125}J) Jodophenyl)-Propionat, Kode: IM. 861, Radiochemical Centre (Amersham,Braunschweig)

Puffersystem 1-3 (s. 2.2.3.1.1.) :

Puffersystem 1 : pH = 7,4
0,01 M Natriumphosphatpuffer
0,14 N NaCl
0,025 M Natriumazid
0,1 % Gelatine

Puffersystem 2 : pH = 7,4
0,01 M Natriumphosphatpuffer
0,14 N NaCl
0,025 M Natriumazid
0,1 % Gelatine
1,0 % Triton X-100

Puffersystem 3 : pH = 7,4
0,01 M Natriumphosphatpuffer
0,14 N NaCl
0,025 M Natriumazid
0,1 % Gelatine
2,5 % Triton X-100
Zusatz von 174 mg/l PMSF

2.1.3. Tiermaterial

2 Ziegen

2.1.4. Geräte

Zentrifugen : Minifuge 2, Heraeus Christ
Kühlzentrifuge Modell-J-21 B, Beckman
Kühlzentrifuge Modell-J-6 B, Beckman

Schüttler : Typ DSG 304, Heidolph

Gamma-Zähler : Beckman Gamma 4000

Glasplatten (9,5 x 9,5 cm)

Stanzschablone, Stanzen, Firma Desaga

Fraktionssammler, Firma Isco

Chromatographiesäule (0,9 x 12 cm) Firma Pharmacia

Membranfilter OE 67, Firma Schleicher u. Schüll

Ultraschallbad

2.2. Methoden

2.2.1. Gewinnung des Ziegenantikörpers

2.2.1.1. Immunisierung der Ziegen mit Metallothionein

Elektrophoretisch reines Metallothionein, aus Rattenlebern isoliert (Abb.1), wurde zur Immunisierung von 2 Ziegen verwendet. Dazu wurde 1 mg Mt der Isoform II mit 1 ml 0,9 % Kochsalzlösung gelöst und mit 2 ml Freundschen Adjuvans (1 ml komplett, 1 ml inkomplett) versetzt.

Die Suspension wurde zur Stabilisierung im Ultraschallbad 1 min bei 400 Watt beschallt.

Je 100 µl dieser Suspension wurden den Tieren an multiplen Stellen (30 Injektionen pro Tier) über den Rücken verteilt intradermal injiziert.

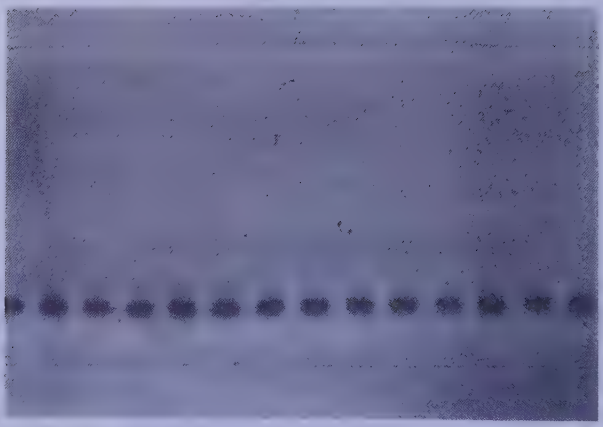
Die Injektionen wurden in monatlichen Abständen über einen Zeitraum von 5 Monaten mit der Hälfte der Injektionsmenge wiederholt.

2.2.1.2. Blutentnahme und Gewinnung von Ziegenserum

Zwei Wochen nach der fünften Injektion wurden jeweils 100 ml Blut entnommen. Die Blutentnahme erfolgte aus der Vena Jugularis. Die Proben wurden zur vollständigen Gerinnung 2 Stunden bei Raumtemperatur gehalten, wonach das Koagel vorsichtig von der Gefäßwand gelöst und mit einem Glasspatel komprimiert wurde.

Die Abtrennung des Serums erfolgte durch eine Zentrifugation bei 3000 Upm in einer Kühlzentrifuge der Firma Heraeus-Christ über 30'. Das Serum wurde dekantiert und erneut bei 3000 Upm 30' zentrifugiert.

Abb. 1:



Polyacrylamid Elektrophorese von Metallothionein (Isoform II) aus Rattenlebern isoliert.

Hierauf wurde das abdekantierte Serum zur Abtrennung der Lipide 60' bei 13000 Upm in einer Kühlzentrifuge der Firma Beckman (Modell J-21 B) zentrifugiert. Danach wurde das Serum in 1 ml Portionen aufgeteilt und bei -20°C tiefgefroren.

2.2.1.3. Nachweis von Antikörper gegen Metallothionein mit Hilfe des Immundiffusionstests nach Ouchterlony

Zum Nachweis von Antikörpern gegen Mt wurde der Immundiffusionstest nach Ouchterlony verwendet (Modifikation nach Garvey, Cremer und Sussdorf, 1977).

1 g Agarose L wurde in 100 ml BBS-Puffer bei 90°C gelöst. Mit jeweils 15 ml dieser Lösung wurden Glasplatten (9,5 x 9,5 cm), die vorher in Äthanol entfettet worden waren, beschichtet (Dicke der Agarschicht ca 1,6 mm).
Die Platten wurden zunächst bei Raumtemperatur, dann im Kühlschrank bei 4°C abgekühlt.
Mit Hilfe einer Stanzschablone wurden in den Agar nach dem in Abb. 2 dargestellten Schema 7 Stanzlöcher ausgehoben (s. 3.1.).
Zur Verhütung der Kapillarsaugwirkung zwischen Glasplatte und Agarfilm wurde der Boden der Stanzlöcher mit einem feinen Agarfilm versehen.
Auf der ersten Platte wurde in die peripheren Stanzlöcher eine Mt-Lösung (Mt in PBS-Puffer gelöst) mit jeweils 500 µg, 250 µg, 125 µg, 62,5 µg und 31,2 µg Metallothionein einpipettiert. Zentral wurde unverdünntes Ziegenserum eingesetzt. Als Kontrolle diente Ziegenpräimmunserum.
Auf der zweiten Platte wurde das Ziegenserum in 50 µl Portionen unverdünnt und in PBS-Puffer gelöst in den Verdünnungen von 1:2, 1:4 und 1:8 in die peripheren Stanzlöcher eingegeben. In das zentrale Stanzloch wurde auf dieser Platte 50 µl einer Mt-Lösung (5 mg/ml PBS entspr. ca 250 µg Metallothionein) einpipettiert.
Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer über 24 - 36 Stunden bei Raumtemperatur.
Nach Auftreten der Präcipitationslinien wurden die Probenreste aus den Stanzlöchern mit einer Pasteurpipette entfernt und die Löcher mit flüssigem Agar ausgefüllt. Das ungebundene Protein wurde durch Eintauchen der Agarplatten zunächst in 0,3 M NaCl-Lösung, dann in 0,15 M NaCl-Lösung in wiederholten Waschvorgängen über 24 Stunden ausgewaschen.
Zum Trocknen des Agars wurde vorsichtig ein Filterpapier auf die Agarober-

fläche gelegt und die Platten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Erst nachdem die Filterpapiere völlig getrocknet waren wurden sie vorsichtig entfernt.

Zur besseren Darstellung der Präcipitationslinien wurde eine Färbung mit Coomassie blue durchgeführt.
Dazu wurden die Agarplatten 10 min in die Farblösung eingetaucht, wonach sie 5 min entfärbt wurden.

2.2.2. Radiomarkierung von Metallothionein mit dem Bolton-Hunter-Reagenz

Die Radiojodierung von Mt wurde nach der von Bolton-Hunter 1973 beschriebenen Methode durchgeführt.
Je 1 mCi ^{125}J-Reagenz wurde in Benzol gelöst und in einem Spitzglas bis zum Trocknen eingedampft.
Die Ränder des Glases wurden mit 250 µl Benzol abgespült und erneut eingedampft. Der trockene Rückstand wurde mit 50 µl eines Boratpuffers, der 5 µg, 10 µg und 50 µg Mt enthielt, aufgenommen.
Die Proben mit 5 µg und 10 µg Mt wurden 30', die mit 50 µg 4 Std. inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 4°C. Danach wurden 0,2 ml Glycinlösung zugegeben und weitere 15' inkubiert. Nach Zusatz von 0,5 ml Natriumphosphat-Gelatine-Puffer (s. 2.1.3.) wurden die Proben zur Abtrennung der freien Aktivität auf eine Sephadex G-25 Chromatographiesäule (0,9 x 12 cm) aufgetragen, die vorher mit Natriumphosphat-Gelatine-Puffer equilibriert und zur Vermeidung einer unspezifischen Adsorption von Mt mit 0,5 ml Albuminlösung (100 mg/ml) behandelt worden war. Die aufgetragene Radioaktivität wurde mit Phosphat-Gelatine-Puffer eluiert und in Portionen zu 1 ml mit einem Fraktionssammler aufgefangen.
Jeweils 100 µl der verschiedenen Fraktionen wurden im Gamma-Zähler ausgezählt. Nach dem Auszählen wurden die Fraktionen, die den Proteinpeak enthielten gepoolt und jeweils mit 1 ml Natriumphosphatpuffer, der 2 % Ziegenpräimmunserum enthielt, zur Stabilisierung versetzt.

2.2.3. Durchführung des Radioimmunoassay für Metallothionein

Das Prinzip eines Radioimmunoassay beruht auf einer kompetitiven Wechselwirkung zwischen dem radioaktiv markierten Tracer-Antigen und dem unmarkierten Kompetitor-Antigen mit dem Antikörper.

Die Konzentration des Kompetitor-Antigens im Testsystem ist unbekannt, kann aber durch die Reduktion der Bindung des Tracer-Antigens mittels einer Standard-Eichkurve ermittelt werden. Daraus ergibt sich, daß eine Abtrennung des ungebundenen Teils des Tracer-Antigens für die Präzision des Tests von essentieller Bedeutung ist.

In dieser Arbeit wurde die Trennung mit Hilfe eines Doppelantikörpertests durchgeführt. Dazu wurde ein Kaninchen-Ak eingesetzt, der den in diesem RIA verwendeten Ziegen-Ak spezifisch bindet. Dadurch wurde eine komplette Ausfällung des Ag-Ak-Komplexes erzielt und seine Abtrennung durch die Membranfiltration erleichtert.

2.2.3.1. Vorversuche zum Radioimmunoassay

2.2.3.1.1. Stabilität von ^{125}J-Metallothionein im Testsystem

Da besonders niedermolekulare Proteine in wässriger Lösung leicht ausfällen, denaturieren oder sich an die Gefäßwand adsorbieren wurde die Stabilität von ^{125}J-Mt in verschiedenen Inkubationssystemen ausgetestet. Das Ziel dieser Untersuchung war, eine möglichst stabile Mt-Suspension zu ermitteln und somit den Probenleerwert zu senken.

Dazu wurden 0,75 ml der verschiedenen Puffersysteme (s.u.) mit 0,1 ml ^{125}J-Mt-Lösung (ca 9125 cpm) und 0,2 ml Kaninchen-anti-Ziegen-Gammaglobulin, das mit isotonischer Kochsalzlösung 1+9 verdünnt worden war, versetzt und bei 4^{o}C über 24 Std. inkubiert.

Danach wurde das Inkubat über Membranfilter OE67 (Firma Schleicher u. Schüll) filtriert. Die Probengefäße wurden zweimal mit 10 ml des jeweiligen Puffers nachgespült und das Eluat erneut filtriert.
Die Filter wurden danach bei 50^{o}C über 2 Std. getrocknet, und anschließend wurde die im Filter retinierte Radioaktivität im Gamma-Zähler gezählt. Die Zählzeit betrug 5 Minuten.

System 1

Als Puffer diente ein 10 mM Natriumphosphatpuffer mit 0,14 N NaCl. Der pH-Wert dieser Lösung war 7,4. Zusätzlich wurde dieser Puffer noch mit Natriumazid versetzt (s. 2.1.2.).

System 2

Das System 2 enthielt die gleichen Komponenten wie System 1, doch wurde zusätzlich noch Gelatine (Endkonzentration 0,1 %) und Triton X-100 (Endkonzentration 1 %) hinzugefügt.

System 3

Im System 3 wurde der Anteil von Triton X-100 auf 2,5 % erhöht und zusätzlich PMSF, ein Proteinaseinhibitor, hinzugefügt (175 mg/l Puffer).

2.2.3.1.2. Bestimmung der Antigenbindungskapazität des Ziegenserums

Zur Bestimmung der Antigenbindungskapazität des Ziegen-Gammaglobulins wurden Verdünnungen von 1:10, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 und 1:3200 mit dem Puffersystem 3 vorgenommen.
Der Ansatz enthielt 0,2 ml der Ziegenserumverdünnung, o,5 ml Puffersystem 3 und 0,1 ml ^{125}J-Mt (ca 9125 cpm). Die Proben wurden 24 Std. bei 4^{o}C inkubiert.
Danach wurden zu jedem Ansatz 0,2 ml Kaninchen-anti-Ziegen-Serum (Verdünnung 1:10) hinzugegeben und erneut 24 Std. bei 4^{o}C inkubiert.
Für den Probenleerwert wurde das Ziegenserum durch Puffer ersetzt.
Der Ansatz der Proben erfolgte jeweils fünffach. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Proben wie unter 2.2.3.1.1. filtriert und ausgezählt.

2.2.3.1.3. Titration des Kaninchen-anti-Ziegen-Serums

Zur Titration des Kaninchen-anti-Ziegen-Serums wurde das Ziegenserum in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt und mit 0,1 ml ^{125}J-Mt (ca 9125 cpm) 24 Std. bei 4^{o}C inkubiert.

Danach wurden 0,2 ml des Kaninchenserums in den Verdünnungen 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80 hinzugegeben und wiederum 24 Std. bei $4^{o}C$ inkubiert.

Alle Verdünnungen erfolgten mit dem Puffersystem 3. Filtration und Zählung erfolgten wie unter 2.2.3.1.1. beschrieben.

2.2.3.1.4. Ermittlung der ABC-33

Um die Möglichkeit einer Spontanpräcipitation in den Meßansätzen zu verhindern wurde die Ziegenserumkonzentration ermittelt, bei der 33 % des angebotenen Tracerantigens an den Antikörper gebunden werden. Obwohl der Antigenexzess an diesem Punkt die Spontanpräcipitation verhindert, wird bereits genug Aktivität gebunden, um ein genaues Meßergebnis zu gewährleisten (Garvey, Cremer und Sussdorf, 1977).

Zur Ermittlung der ABC-33 wurde das Ziegenserum mit BBS-Puffer in den Verdünnungsstufen von 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 und 1:1600 eingesetzt.
Die Ansätze und die Inkubationszeiten erfolgten wie unter 2.2.3.1.2. beschrieben.
Zur Trennung des ungebundenen Tracer-Antigens wurde das Kaninchen-anti-Ziegen-Serum in einer Verdünnung von 1:5 verwendet.

2.2.3.2. Erstellung der Eichkurve zur Bestimmung von Metallothionein

Zur Erstellung der Eichkurve wurde Mt in einer Konzentration von 0,00097 µg bis 1 µg/0,5 ml Puffersystem 3 (s. 2.2.3.1.1.) eingesetzt.
Das Ziegenserum wurde in einer Verdünnung von 1:500 (s. 3.3.4.), das Kaninchenserum in einer Verdünnung von 1:5 (s. 3.3.3.) eingesetzt.
Proben, 100 %-Wert und Leerwert wurden jeweils fünffach angesetzt.

Folgende Versuchsanordnung wurde angewandt:

	Probe	100 %-Wert	Leerwert
Mt - Lösung	0,5 ml	-	-
Puffer	-	0,5 ml	0,7 ml
^{125}J - Mt	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Ziegenserum (1 : 500)	0,2 ml	0,2 ml	-
	Inkubation 24 Std. bei 4°C		
Kaninchenserum (1 : 5)	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
	Inkubationszeit 24 Std. bei 4°C		

Abtrennung der ungebundenen Aktivität und Zählung erfolgten wie unter 2.2.3.1.1. beschrieben.

Um die erzielten Meßwerte mit der eingesetzten Radioaktivität prozentmäßig in Verbindung zu bringen, wurden sie nach der folgenden Formel, in die auch der Leerwert eingeht, umgerechnet:

$$\% \text{ Bound} = \frac{(\text{cpm Probe}) - (\text{cpm Leerwert})}{(\text{cpm 100 \%}) - (\text{cpm Leerwert})} \times 100$$

2.2.4. Erprobung des Radioimmunoassay durch Metallothionein-Messungen im Urin

2.2.4.1. Auswirkungen des Urins auf die Eichkurve
(Ergebnisse s. S. 30)

Um eine Interaktion zwischen dem Urin und dem Testsystem zu prüfen, wurde zu dem Ansatz des Radioimmunoassay vergleichend in einem ersten Versuch 50 µl Urin, in einem zweiten 50 µl Puffersystem 3 hinzugegeben. Die Ansätze erfolgten jeweils fünffach.

2.2.4.2. Metallothionein-Messung im Urin
(Ergebnisse s.S.34)

Zur Erprobung des Radioimmuniassay wurde von 4 weiblichen und 6 männlichen Probanden der Morgenurin untersucht.
Im Ansatz wurden 0,05 ml Urinprobe, 0,1 ml ^{125}J-Mt und 0,2 ml Ziegenserum (1:500) eingesetzt.
Die Inkubation erfolgte bei 4^{o}C über 24 Std.. Die weitere Aufbereitung erfolgte wie unter 2.2.3.1.1. beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1. Gewinnung des Ziegenantikörpers

Zwei Wochen nach der 5. Injektion konnte bei einer Ziege im Agardiffusionstest nach Ouchterlony ein Antikörper gegen Metallothionein nachgewiesen werden. Das Ergebnis ist in Abb. 2 und 3 dargestellt (s.S. 21 u. 22).

Auf der ersten Agarplatte (Abb. 2) ließ sich eine feine Präcipitationslinie nachweisen, die mit abnehmender Antigenkonzentration zur Peripherie hinwandert. Die niedrigste Mt-Konzentration, bei der noch eine deutliche Präcipitationslinie nachweisbar war, lag bei 31,2 µg Mt. Mit abnehmender Antigenkonzentration kommt es zu einem Antikörperexzess, wodurch die Präcipitationslinie, auf der Antigen und Antikörper in gleichen Konzentrationen vorliegen, in die Peripherie verlagert wird.
Das zur Kontrolle aufgetragene Präimmunserum der Ziege erbrachte keine Präcipitationslinie.

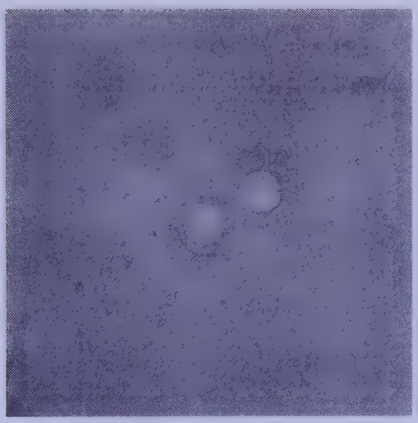
Das Ergebnis der Antikörper-Verdünnung gegen Mt II ist in Abb. 3 dargestellt. Auf dieser Agarplatte verlagert sich die Präcipitationslinie ebenfalls mit zunehmenden Verdünnungsstufen des Ziegenserums in die Peripherie. Während sich bei einer Ziegenserumverdünnung von 1+3 noch eine deutliche Präcipitationslinie zeigte, konnte bei höheren Verdünnungsstufen, auch durch eine Verlängerung der Inkubation, kein Präcipitat nachgewiesen werden.

Der durch Immunisierung mit Mt-II aus Rattenlebern gewonnene Ziegenantikörper zeigte im Agardiffusionstest eine eindeutige Kreuzreaktion gegen Mt-I aus Rattenlebern, gegen Mt aus Kaninchenlebern und gegen humanes Leber-Mt (Untersuchung von Abel, Institut für Toxikologie, Universität Düsseldorf).

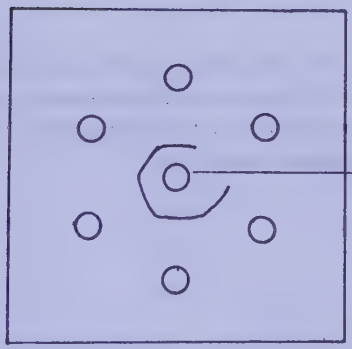
3.2. Radiomarkierung von Metallothionein mit dem Bolton-Hunter-Reagenz

Das erzielte Elutionsprofil nach chromatographischer Abtrennung der ungebundenen Radioaktivität zeigt Abb. 4 (s.S. 23). Die ersten fünf Fraktionen enthielten keine Aktivität. Von der 6. bis zur 14. Fraktion wurde das Protein mit einem Aktivitätsmaximum in der 11. Fraktion eluiert.

Abb. 2:



500 µgMt



Nachweis von Antikörper gegen Metallothionein mit Hilfe des Immundiffusionstests nach Ouchterlony. Die Präcipitationslinie reicht bis zu der Mt-Menge von 31,2 µg.

Abb. 3:

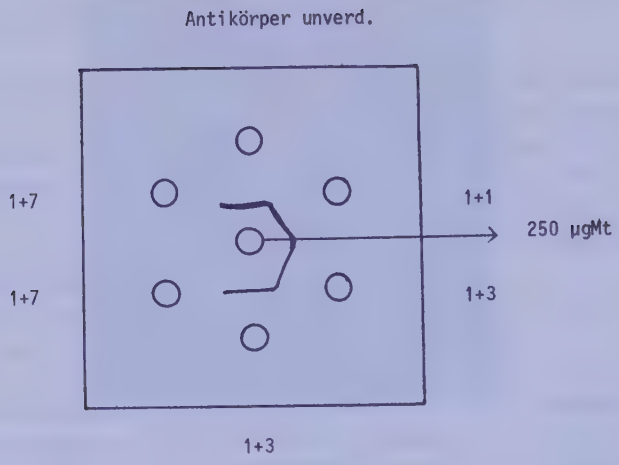
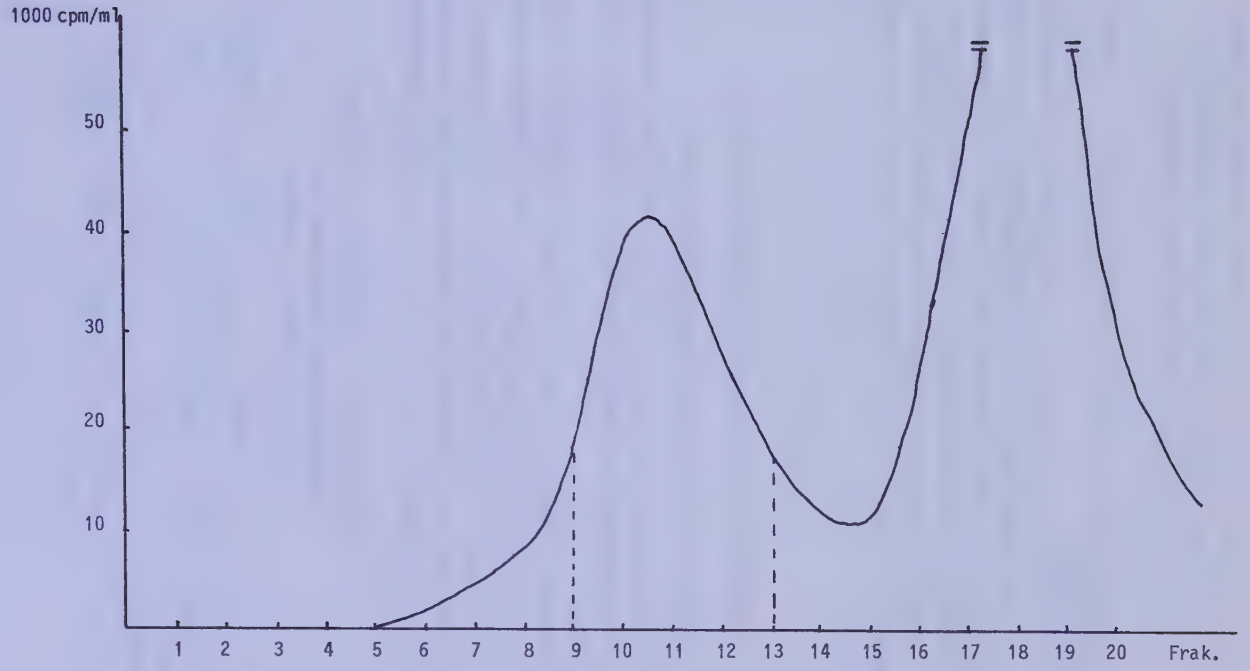


Abb. 3 zeigt die Agarplatte, auf der das Ziegenserum um das zentral eingegebene Metallothionein verdünnt wurde. Die Präcipitationslinie erstreckt sich bis zu der Ziegenserumverdünnung 1+3.

Abb. 4:



Abtrennung der gebundenen und ungebundenen Radioaktivität über Sephadex G-25. (Säule: 0,9 x 12 cm; Fraktionsvolumen 1 ml). Die Fraktionen 9-13 (Mt-haltige Fraktionen) wurden gepoolt.

Die erneute Aktivitätszunahme ab der 15. Fraktion entsprach der später eluierten ungebundenen Aktivität. Wegen der hohen Kosten wurden nur 3 Experimente zur Radiojodierung von Metallothionein vorgenommen.

Die Markierungsausbeute von den 3 Radiojodierungen ist in Tab. 1 zusammengefaßt (s.S. 25).
Es zeigte sich, daß bei zunehmender Proteinkonzentration die Markierungsausbeute zunimmt. Jedoch lag bei allen Markierungsversuchen die prozentuale Ausbeute unter 2 % der eingesetzten Radioaktivität. Die errechnete spezifische Aktivität schwankt erheblich und liegt bei zwei Markierungsversuchen zwischen 0,35 und 0,53 µCi/µmol Mt. Ferner zeigte sich, daß die Verlängerung der Inkubationszeit die Markierungsausbeute nicht wesentlich beeinflußt.

3.3. Durchführung des Radioimmunoassay für Metallothionein

3.3.1. Stabilität von ^{125}J-Metallothionein im Testsystem

Von der im Puffersystem 1 (s. 2.2.3.1.1.) eingesetzten Radioaktivität wurden als Mittelwert von 5 Ansätzen 1398 cpm (15,3 %) im Membranfilter wiedergefunden.
Durch Zusatz von Gelatine und Triton X-100 konnte im Puffersystem 2 die im Membranfilter retinierte Aktivität auf 642 cpm (7,03 %) gesenkt werden.

Durch die Erhöhung der Triton X-100-Konzentration und den zusätzlichen Einsatz von PMSF wurde die im Membranfilter retinierte Aktivität weiter auf 109,5 cpm (1,2 %) reduziert. In Tab. 2 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Tab. 2: Untersuchungen der Stabilität von ^{125}J-Mt in verschiedenen Testsystemen (s. 2.2.3.1.1.) Mittelwert aus jeweils 5 Ansätzen

	System 1	System 2	System 3
Probenleerwert (cpm)	1398	642	109
% der einges. Akt.	15,3	7,03	1,2

Tabelle 1: Ergebnisse der Radiojodierung von Metallothionein von 3 unabhängigen Experimenten

Mt (µg)	Mt (µmol)	Inkub. (min)	Einges.Akt. (cpm)	Eluiert.Akt. (cpm)	Spez.Akt. (cpm/µmol)	Spez.Akt. (µCi/µmol)	Ausbeute %
5	0,00071	30	$2,4 \times 10^9$	$1,8 \times 10^6$	$0,25 \times 10^4$	0,001	0,075
10	0,0014	30	$2,4 \times 10^9$	$1,2 \times 10^7$	$8,5 \times 10^5$	0,35	0,5
50	0,0071	240	$4,8 \times 10^9$	$9,2 \times 10^7$	$1,29 \times 10^6$	0,53	1,9

3.3.2. Bestimmung der Antigenbindungskapazität des Ziegenserums

Zur Bestimmung der Antigenbindungskapazität des Ziegen-Antikörpers wurde das Ziegenserum in den Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 und 1:3200 eingesetzt (s.2.2.3.1.2.).
Das Kaninchenserum wurde dabei zunächst 1:10 verdünnt. Das Ergebnis des Versuchs wird in Tab. 3 und Abb. 5 (S.27) dargestellt. Bei einer Ziegenserum-Verdünnung von 1:200 werden maximal 22,9 % der eingesetzten Radioaktivität präcipitiert.

Tab. 3: Bestimmung der Antigenbindungskapazität des Ziegenantikörpers

Serumverdünnung	Gebundene Akt.	% Bound
100 %-Wert	9125	
Leerwert	116	1,2
1/10	51,7	0,5
1/100	364,6	3,9
1/200	2094,7	22,9
1/400	1528,8	16,7
1/800	1071,4	11,7
1/1600	714	7,8
1/3200	407	4,4

3.3.3. Titration des Kaninchenserums

Der zur besseren Abtrennung des radiojodmarkierten Ag-Ak-Komplex eingesetzte Kaninchen-anti-Ziegen-Antikörper wurde zur Bestimmung seiner optimalen Bindungskapazität in den unter 2.2.3.1.3. beschriebenen Bedingungen austitriert. Das Ergebnis ist in Tab. 4 sowie in Abb. 6 (S. 28) dargestellt. Daraus geht hervor, daß bei einer Verdünnung des Kaninchenserums von 1:5 und

Abb. 5

Ergebnis der Bestimmung der Antigen-
bindungskapazität des Ziegenserums

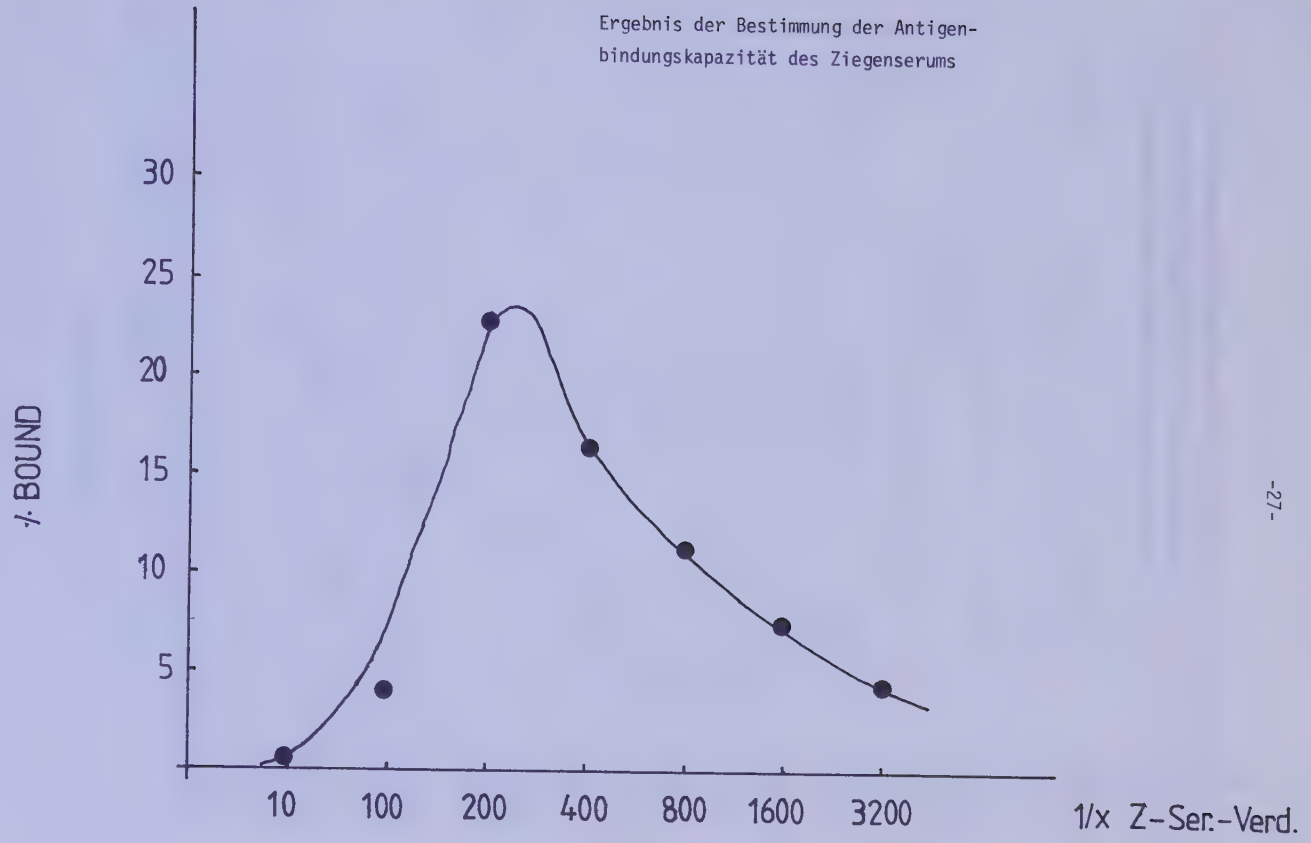
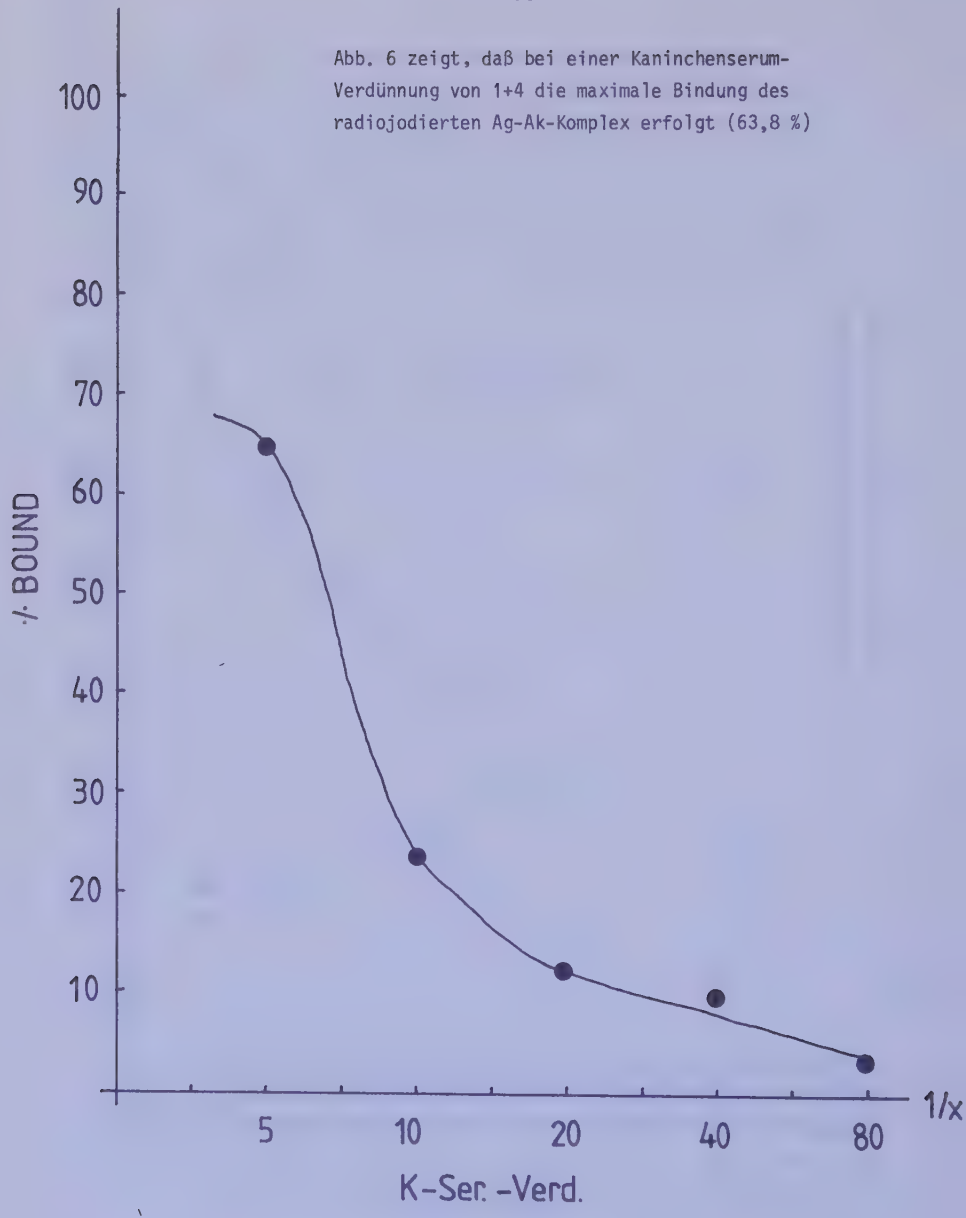


Abb. 6

Abb. 6 zeigt, daß bei einer Kaninchenserum-Verdünnung von 1+4 die maximale Bindung des radiojodierten Ag-Ak-Komplex erfolgt (63,8 %)



einer Verdünnung des Ziegenserums von 1:200 63,8 % der eingesetzten Radioaktivität maximal präcipitiert werden. Bei allen weiteren Versuchen wurde daher eine Kaninchenserum-Verdünnung von 1:5 eingesetzt.

Tab.4: Ergebnis der Titration des Kaninchenserums bei einer Ziegenserum-Verdünnung von 1:200 (s. 3.3.2.). Alle Verdünnungen erfolgten mit Puffersytem 3 (s. 2.2.3.1.1.). Eingesetzte Radioaktivität ca 9125 cpm.

Kaninchenserum-Verdünnung	Gebundene Akt. (cpm)	% Bound
1 : 5	5870	63,8
1 : 10	2194	23.0
1 : 20	1204	12,0
1 : 40	943,1	10,4
1 : 80	149	0,3

3.3.4. Ermittlung der ABC-33

Zur Ermittlung der ABC-33 wurden 0,2 ml Ziegenserum in den Verdünnungen 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 und 1:1600 eingesetzt. Der Ansatz enthielt 0,1 ml ^{125}J-Mt (ca.9125 cpm) und 0,5 ml Puffersystem 3 (s. 2.2.3.1.4.). Tab. 5 und Abb. 7 (S. 31) zeigen das Ergebnis des Versuchs. Angegeben werden Mittelwerte aus jeweils 5 Bestimmungen.

Bei einer Ziegenserum-Verdünnung von 1:100 wurden maximal 65 % der eingesetzten Aktivität gebunden. Die 33 %ige Bindungskapazität liegt bei einer Serumverdünnung von etwa 1 : 500 vor (s.Abb. 7).

Tab. 5: Ermittlung der ABC-33 des Ziegenantikörpers
Mittelwerte von jeweils 5 Bestimmungen

Ziegenserumverd.	Gebundene Akt.	% Bound
1 : 100	6078	65,4
1 : 200	5885	62,9
1 : 400	3649	39
1 : 800	1428	15,2
1 : 1600	780	8,3

3.3.5. Erstellung der Standard-Eichkurve zur Bestimmung von Metallothionein

Die Eichkurve wurde mit Metallothionein-Konzentrationen von 0,00097 bis 1 µg/0,5 ml Puffersystem 3 erstellt. Die Mittelwerte aus jeweils 5 Bestimmungen wurden nach der unter 2.2.3.2. beschriebenen Formel umgerechnet und in die Kurve eingezeichnet. Das Ergebnis ist in Abb. 8 (S. 32) dargestellt.
Die absolute untere Nachweisgrenze beträgt 5 ngMt. Der optimale Meßbereich liegt auf dem steilen Abschnitt der Kurve zwischen 10 ng und 100 ng Mt.

3.4. Erprobung des Radioimmunoassay durch Metallothionein-Messungen im Urin

3.4.1. Auswirkung des Urins auf die Eichkurve

Das Ergebnis dieser Untersuchung wird in Abb. 9 (S. 33) dargestellt. Die Abbildung zeigt vergleichend zwei Eichkurven, wobei bei der einen 0,05 ml Urin, bei der anderen 0,05 ml Puffersystem 3 hinzugefügt wurden. Es zeigt sich, daß beide Kurven bis zu einer Schwelle von etwa 20 ng Metallothionein annähernd deckungsgleich verlaufen.

Abb. 7:

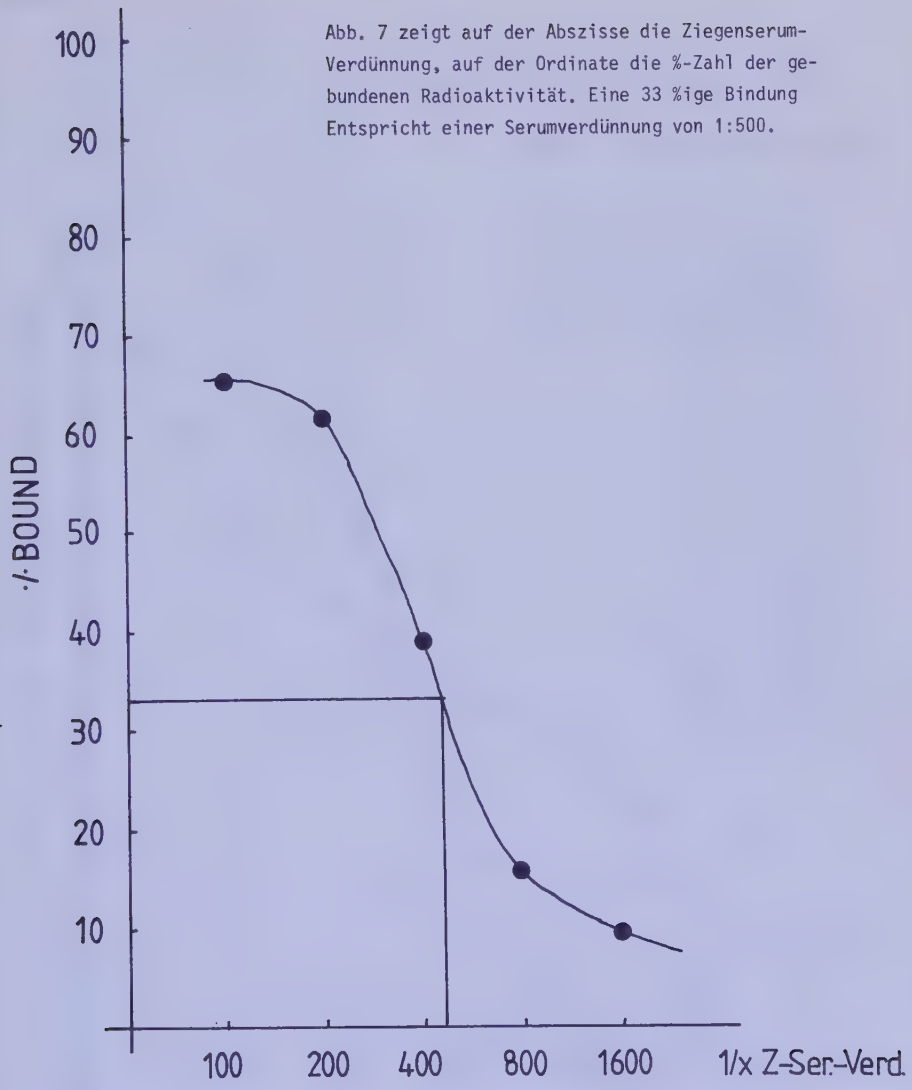


Abb. 7 zeigt auf der Abszisse die Ziegenserum-Verdünnung, auf der Ordinate die %-Zahl der gebundenen Radioaktivität. Eine 33 %ige Bindung Entspricht einer Serumverdünnung von 1:500.

Abb. 8:

Standard-Eichkurve des Radioimmunoassay für Metallothionein. Einsatz von Mt-Konzentrationen zwischen 0,00097 und 1 µg/0,5 ml Puffersystem 3 0,1 ml ^{125}J-Mt-Lösung (ca 9125 cpm), 0,2 ml Ziegenserum (Verd. 1:500) und 0,2 ml Kaninchen-anti-Ziegen-Serum (Verd. 1:5)

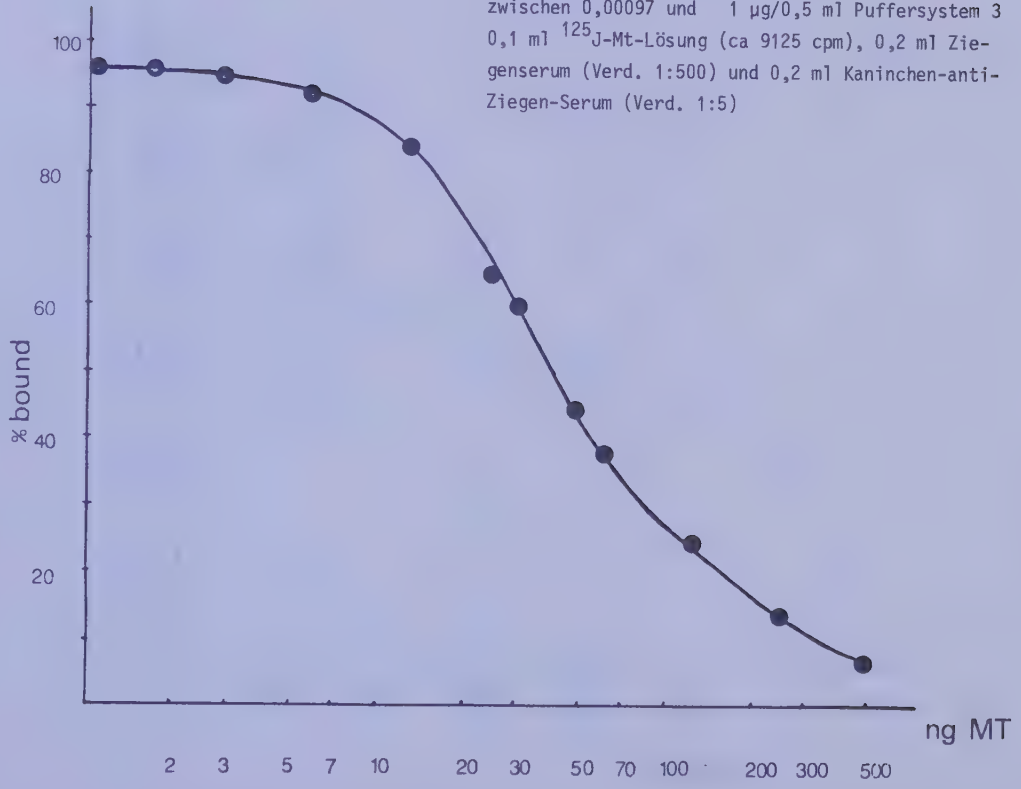


Abb. 9:

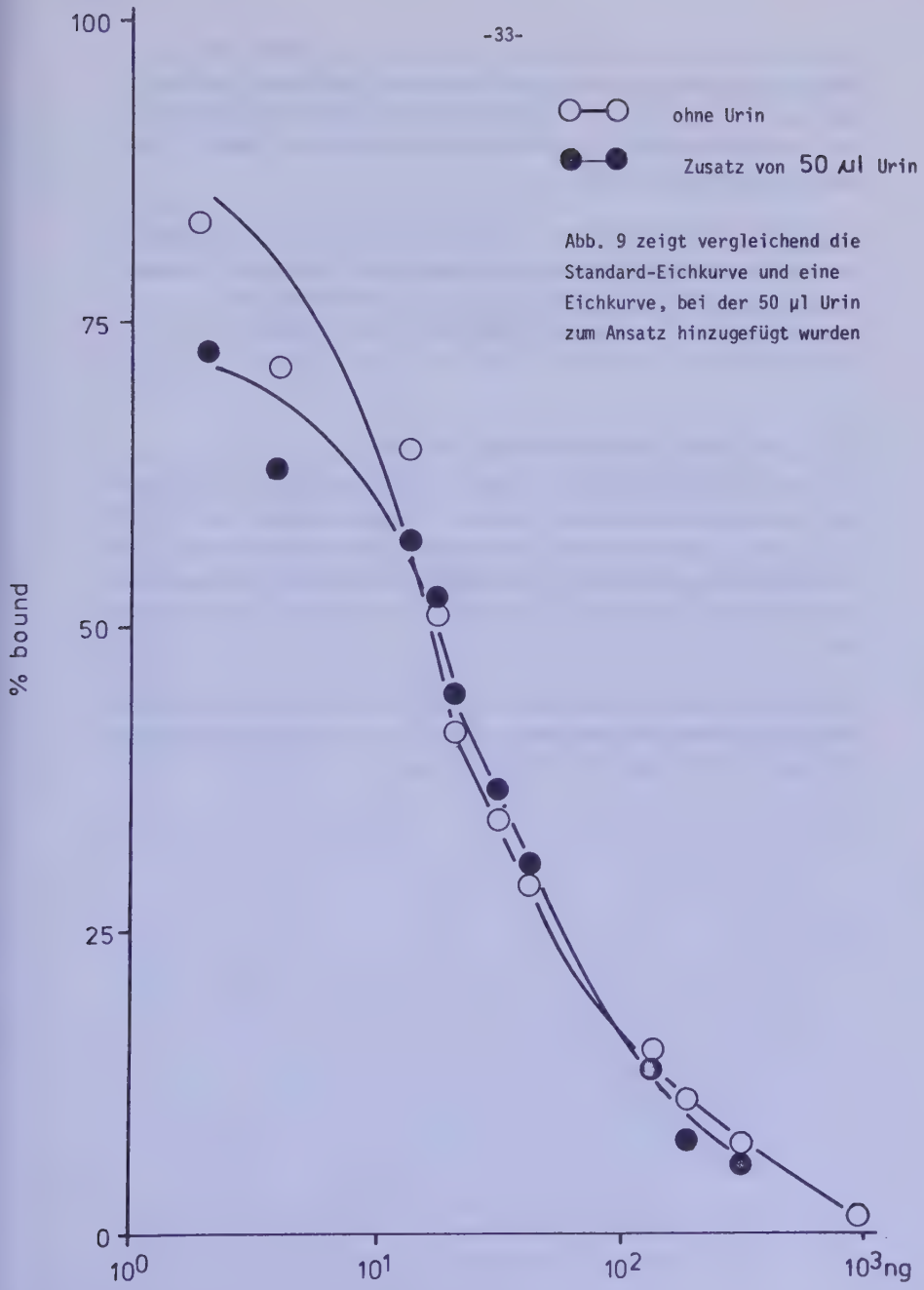


Abb. 9 zeigt vergleichend die Standard-Eichkurve und eine Eichkurve, bei der 50 µl Urin zum Ansatz hinzugefügt wurden

Unterhalb dieser Schwelle weicht die Eichkurve mit dem Urinzusatz von der Standard-Eichkurve ab. Aus dem Kurvenverlauf geht hervor, daß die Abweichung durch ein im Urin ausgeschiedenes Metallothionein hervorgerufen werden muß und nicht etwa durch eine Veränderung der Sensitivität oder Spezifizität verursacht wird.

Es zeigt sich somit ferner, daß der Ziegenantikörper, der durch Immunisierung mit Ratten-Metallothionein gebildet wurde, mit humanem Mt kreuzreagiert (s. S. 20, 3.1.) und daß die übrigen Urinbestandteile die Standard-Eichkurve im angegebenen Meßbereich nicht beeinflussen.

3.4.2. Bestimmung von Metallothionein im Urin

Das Ergebnis der Messungen ist in Tab. 6 (S.35) dargestellt. Die Ausscheidung von Metallothionein im Urin bewegt sich in einem Bereich von 70 - 200 µg/l, wobei am zweiten Tag bei zwei Probanden ein Wert über 400 µg/l gefunden wurde. Insgesamt unterliegt die tägliche Ausscheidung keinen großen Variationen und liegt in der Variationsbreite der normalen Proteinausscheidung.

Bezieht man die Metallothioneinausscheidung auf die ausgeschiedenen Kreatininkonzentrationen, so zeigt sich, daß bei Frauen die Metallothioneinausscheidung deutlich höher ist, als bei Männern.

Tabelle 6: Metallothioneingehalte im Urin

Proband	Geschlecht	1. Tag		2. Tag		3. Tag	
H.D.	m	75[1)]	16[2)]	75	11	80	20
L.M.	m	112	16	114	14	90	11
H.S.	m	195	21	463	69	188	27
W.H.O.	m	105	12	455	10	195	13
G.O.	w	90	18	75	28	105	24
H.O.	w	113	22	225	66	75	37
U.K.	w	127	49	148	34	78	43
B.S.	w	72	64	118	24	90	26
W.K.	m	150	28	96	15	88	10
W.O.	m	142	22	124	19	182	21

1) In Mikrogramm/Liter
2) In Mikrogramm/g Kreatinin

4. Diskussion

4.1. Gewinnung des Ziegenantikörpers gegen Metallothionein

Zur Immunisierung der Ziegen wurde elektrophoretisch reines Metallothionein II aus Rattenlebern eingesetzt (s. 2.2.1.1.). Da Metallothioneine ein niedriges Molekularvolumen besitzen (6000-8000 Datons) nahmen andere Autoren eine Polymerisation des Mt mit Glutaraldehyd vor, um seine Antigenität zu verstärken (Chang, Vander Mallie und Garvey, 1980).

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht polymerisiertes Mt eingesetzt und trotzdem eine ausreichende Antikörperproduktion erzielt. Um den antigenen Reiz des Mts zu verstärken wurde lediglich das Metallothionein mit Freundschem Adjuvans kombiniert.

Während bei Chang, Vander Mallie und Garvey das aus Kaninchen gewonnene Antiserum gegen Mt in einer Verdünnung von ca 1:25.000 eingesetzt wird, um 33 % des Tracerantigens zu binden, muß hier das Ziegenserum in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt werden.

Der Ziegenantikörper zeigt eine eindeutige Kreuzreaktion gegenüber dem bei der Erstellung der Eichkurve eingesetzten Rattenleber-Mt-I, sowie gegenüber Mt aus menschlichem Urin (Untersuchung von Abel, Inst.f.Toxikologie, Universität Düsseldorf).

Kreuzreaktionen zwischen Mts verschiedenen Ursprungs untersuchten auch Vander Mallie und Garvey (1979). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die verschiedenen Metallothioneine sehr ähnliche antigene Determinanten besitzen. Somit müssen die Tertiärstrukturen eine große Ähnlichkeit besitzen, was durch die von Kägi und Mitarbeiter (1979) nachgewiesene Homologie in der Aminosäuresequenz der Mts verschiedenen Ursprungs unterstützt wird.

4.2. Markierung von Metallothionein mit ^{125}J

Bei der Radiojodierung von Mt mit dem Bolton-Hunter-Reagenz konnte nur eine geringe Markierungsausbeute erzielt werden (s.Tab.1, S.18). Dafür kommen verschiedene Gründe infrage. Da wegen der hohen Kosten nur insgesamt 3 Expe-

rimente durchgeführt wurden, konnten nur ungenügende Erfahrungen gesammelt werden. So erklärt sich zumindest die mit 0,075 % extrem geringe Ausbeute im ersten Experiment. Im zweiten Experiment konnte die Ausbeute auf 0,5 % erhöht werden, nachdem der Proteineinsatz lediglich verdoppelt wurde.

Im dritten Experiment lag die Ausbeute nach weiterer Erhöhung des eingesetzten Metallothioneins mit 1,9 % leicht über der von Brady und Kafka (1979) erzielten Markierungsausbeute (1,2 %). Bei diesen Autoren konnte das radiojodierte Mt durch den Antikörper jedoch nicht mehr ausgefällt werden, was höchstwahrscheinlich auf eine Veränderung der antigenen Determinanten durch den Markierungsvorgang bewirkt wurde.

Die insgesamt niedrige Ausbeute erklärt sich weiterhin dadurch, daß das Bolton-Hunter-Reagenz ausschließlich mit den E-Amino-Gruppen des Lysins reagiert. Die spezifische Aktivität lag mit Werten zwischen $8{,}5 \times 10^5$ cpm/µmol Mt und $1{,}29 \times 10^6$ cpm/µmol Mt in der Größenordnung der von Brady und Kafka (1979) erzielten Werte ($2{,}2 \times 10^5$ cpm/µmol Mt).

4.3. Meßbereich des Radioimmunoassay

Bei den herkömmlichen quantitativen Nachweisverfahren wurde die Metallothionein-Konzentration nach chromatographischer Reinigung des Proteins über spektrophotometrische Messungen des Metallgehaltes (Cd oder Zn) bestimmt. Der unterste Meßbereich lag dabei bei 5-10 µg Protein (Day, Coles und Brady, 1978; Panemangalore und Brady, 1978).

Diese Sensibilität ist ausreichend, um Mt in Leber und Niere zu messen. In kleinen Proben oder in anderen Geweben oder in Urin und Blut ist der quantitative Nachweis von Mt damit jedoch nicht möglich.

Der hier beschriebene Radioimmunoassay hat einen Meßbereich zwischen 10 - 500 ng mit einer absoluten unteren Nachweisgrenze von 5 ng und entspricht somit den Meßbereichen von Brady und Kafka (1979), Vander Mallie und Garvey (1979) und Chang, Vander Mallie und Garvey (1980).

4.4. Bestimmung von Metallothionein im Urin

Metallothionein wird durch die Glomerula in den Primärharn filtriert und selektiv im proximalen Tubulus rückresorbiert (Murakami und Webb, 1980).

Die Absorption erfolgt über Pinocytose, wonach in den Lysosomen das Metall vom Liganden abdissoziiert wird und das Metallothionein proteolytisch gespalten wird (Cherian, 1977).

Die physiologische Harnausscheidung von Mt erklärt sich daher nur über die Zellabschilferung, der die Tubulusepithelien bei ihrer ständigen Regeneration unterworfen sind.

Die unter 3.4.2. beschriebenen Messungen zeigen, daß diese Ausscheidung relativ konstant ist und bei einer durchschnittlichen Eiweißausscheidung von 45 - 75 mg/g Kreatinin/24 Std. 0,03 - 0,34 % der Eiweißausscheidung darstellt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Auswirkung des Urins auf die Eichkurve stimmen mit den Studien von Chang, Vander Mallie und Garvey (1980) überein. Während diese Autoren das Abweichen der Kurven in den niedrigen Meßbereichen (bis etwa 10 ng Mt) auf eine erhöhte unspezifische Bindung zurückführten, vermuten wir eine Beeinflussung durch das in diesen Konzentrationen ausgeschiedene natürliche Urin-Mt.

Untersuchungen von Roels und Mitarbeiter (1981) haben gezeigt, daß die Urinausscheidung von Cd mit Cd-Konzentrationen in Leber und Nieren bei normaler Nierenfunktion korrelieren. Tohyama und Mitarbeiter (1981b) kamen zu dem gleichen Ergebnis bezüglich der Mt-Ausscheidung.

Die neuesten Untersuchungen von Roels und Mitarbeiter (1983) zeigten, daß Mt- und Cd-Ausscheidung im Urin unabhängig von der Nierenfunktion und von der Cadmiumbelastung des Organismus korrelieren, und daß beide Parameter eine Beurteilung der Gesamtbelastung des Organismus durch Cd erlauben. Möglicherweise liegt der Vorteil der Mt-Messung lediglich darin, daß eine sekundäre Kontamination der Proben ausgeschlossen ist.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird ein Radioimmunoassay für Metallothionein beschrieben, dessen Sensibilität einen quantitativen Nachweis von Mt im biologischen Material auch nicht Cadmium-belasteter Organismen erlaubt.

Durch Immunisierung von Ziegen mit elektrophoretisch reinem Rattenlebern-Mt II konnte ein Antikörper hergestellt werden, der eine komplette Kreuzreaktion mit Rattenlebern-Mt I und mit humanem Mt zeigte.

Die Markierung von Metallothionein mit ^{125}J erfolgte mit dem Bolton-Hunter-Reagenz und erbrachte trotz relativ geringer Markierungsausbeute (1,9 %) eine hohe spezifische Aktivität von $1{,}29 \times 10^6$ cpm/umol Mt.

Zur Ausfällung des markierten Ag-Ak-Komplex wurde ein Kaninchen-anti-Ziegen-Antikörper eingesetzt. Die Abtrennung der ungebundenen Aktivität erfolgte über Membranfiltration.

Der optimale Meßbereich des RIA liegt zwischen 10 - 500 ng Mt. Die Untersuchungen der Auswirkungen von Urin auf die Eichkurve ergaben keine Veränderung der Sensibilität oder Spezifizität. Zur Erprobung des Radioimmunoassay wurden Urinproben von zehn Probanden untersucht. Dabei wurden Mt-Konzentrationen zwischen 72 µg/l und maximal 463 µg/l gemessen.

Der Radioimmunoassay bietet die Möglichkeit, durch Mt-Messungen im Urin chronische Cadmiumintoxikationen oder Erkrankungen, die zu einer Alteration des Tubulusepithels führen, zu erkennen.

6. Literaturverzeichnis

Babich,H und Stotzky,G (1978):
Effects of cadmium on the biota: influence of environmental factors.
Adv. Appl. Microbiol. 23, 55-117.

Bakka,A und Webb,M. (1981):
Metabolism of zinc and copper in the neonate: changes in the concentrations and contents of thionein- bound Zn and Cu with age in the livers of the newborn of various mammalian species.
Biochem. Pharmacol. 30, 721.

Bolton,A.E. und Hunter,W.M. (1973):
The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ^{125}J-containing acylating agent.
Biochem. J. 133, 529-539.

Brady,F.O. und Kafka,R.L. (1979):
Radioimmunoassay of rat liver metallothionein.
Analyt. Biochem. 98, 89-94.

Buell,G. (1975):
Some biological aspects of cadmium toxicology, review article.
J. Occup. Med. 17, 189.

Chang,O.C., Vander Mallie,R.J., Garvey,J.S. (1980):
A radioimmunoassay for human metallothionein.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 55, 94-102.

Cherian,M.G. (1977):
Induction of renal metallothionein synthesis by parenteral cadmium-thionein in rats.
Biochem. Pharmacol. 27, 1163-1166.

Cherian,M.G., Goyer,R.A. (1978):
Metallothionein and their role in the metabolism and toxicity of metals.
Life Science 23, 1-10.

Cousins,R.J. (1979):
Regulatory aspects of zinc metabolism in liver and intestine.
Nutr. Rev. 37, 97.

Day,F.A., Coles,B.J., Brady,F.O. (1978):
Postinductive actinomycin D effects on the concentration of cadmium thionein, zinc thionein and copper chelatin in rat liver.
Bioinorg. Chem. 8 93-105.

Diehl,J.F. (1981):
Die Belastung des Verbrauchers durch Cadmium - eine kritische Übersicht. Berichte der Forschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe.

Environmental Protection Agency (1981):
Health assessment document for cadmium. U.S. EPA, Office of Research and Development; Research Triangle Park, N.C. 27711.

Fleischer,M. und Mitarbeiter (1974):
Environmental impact of cadmium: a review by the panel on hazardous trace substances. Environ. Health Perspec. 7, 232-253.

Friberg,L., Piscator,M., Nordberg,G.F., Kjellström,T. (1974):
Cadmium in the environment. 2nd Edition, CRC Press Inc., Cleveland, Ohio.

Garvey,J.S., Cremer.N.E., Sussdorf,D.H. (1977):
Methods in immunology. 3rd Edition, W.A. Benjamin Inc..

Kägi,J.H.R., Vallee,B.L. (1960):
Metallothionein: a cadmium and zinc containing protein from the equine renal cortex. J. Biol. Chem. 235, 3460-3465.

Kägi,J.H.R., Vallee,B.L. (1961):
Metallothionein: a cadmium and zinc containing protein from equine renal cortex II. Physicochemical Properties. J. Biol. Chem. 236, 2435-2442.

Kägi,J.H.R. und Mitarbeiter (1979):
Metallothionein: structure and evolution. In: Metallothionein, Ed.: Kägi,J.H.R., Nordberg,M. (1979). Birkhäuser Verlag, Basel.

Kägi,J.H.R. und Mitarbeiter (1983):
Characterization of isoprotein patterns in tissue extracts and isolated samples of metallothioneins by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. Biochem. J. 209, 71-80.

Kello,D. und Mitarbeiter (1979):
On the role of metallothionein in cadmium absorption by rat jejenum in situ. Tox. 14 (3), 199-208.

Margoshes,M., Vallee,B.L. (1957):
A cadmium protein from equine kidney cortex. J. Amer. Chem. Soc, 79, 4813-4814.

Menard,M.P. und Mitarbeiter (1981):
Regulation of intestinal metallothionein biosynthesis in rats by dietary zinc.
J. Nutr. 111 (8), 1353-1361.

Murakami,M., Webb,M. (1981):
A morphological and biochemical study of the effects of l-cystein on the renal uptake and nephrotoxicity of cadmium.
Br. J. exp. Path. 62, 115.

Nogawa,K., Ishizaki,A., Kawano,S. (1975):
Statistical observations of the dose-response relationship of cadmium based on epidemiological studies in the Kakehashi river basin.
Environ. Res. 15, 280.

Nordberg,G.F. (1971):
Effects of acute and chronic cadmium exposure on the testicles of mice.
Environ. Physiol. Biochem. 1, 171-187.

Nordberg,G.F. (1972):
Cadmium metabolism and toxicity - experimental studies on mice.
Environ. Physiol. Biochem. 2, 7-36.

Nordberg,G.F., Goyer,R.A., Nordberg,M. (1975a):
Comparative toxicity of cadmium metallothionein and cadmium chloride on mouse kidney.
Arch. Pathol. 99, 192-197.

Nordberg,G.F. (ed.) (1976):
Effects and dose-response; relationship of toxic metals.
Amsterdam, Elsevier.

Nordberg,M. (1978):
Studies on metallothionein and cadmium.
Environ. Res. 15, 381-404.

Ohnesorge,F.K. (1983):
VDI-Bericht: Schwermetalle, im Druck.

Panemangalore,M., Brady,F.O. (1979):
Induction and synthesis of metallothionein in isolated perfused rat liver.
J. Biol. Chem. 253, 7898-7904.

Piscator,M. (1964):
On cadmium in normal human kidneys together with a report on the isolation of metallothionein from livers of cadmium exposed rabbits.
Nord. Hyg. Tidskr. 45, 76-82

Piscator,M. (1976):
The chronic toxicity of cadmium.
In: Prasad,A.S. (Ed.): Trace elements in human health and disease, Vol. II, N.Y., p.431.

Richards,M.P., Cousins,R.J. (1975):
Mammalian zinc homeostasis: requirement for RNA and metallothionein synthesis.
Biochem. Biophys. Res. Chem. 64, 1215-1223.

Roels,H.A. und Mitarbeiter (1981):
In vivo measurement of liver and kidney cadmium in workers exposed to this metal: its significance with respect to cadmium in blood and urine.
Environ. Res. 26, 217-240.

Roels,H.A. und Mitarbeiter (1983):
Significance of urinary metallothionein in workers exposed to cadmium.
Arch. Occup. Environ. Health 52, 159-166.

Sugawara,N. (1982):
Role of metallothionein in zinc uptake from rat jejunum.
Devel. Tox. Environ. Science 9, 155-162.

Tohyama,C. und Mitarbeiter (1981 b):
Metallothionein excretion in urin upon cadmium exposure: its relationship with liver and kidney cadmium.
Toxicology 22, 181-191.

Tsuchay,K. (1976 b):
Epidemiological studies on cadmium in the environment of Japan: etiology of itai-itai disease.
Fed. Proc. 35 (12), 2412.

UBA, Umweltbundesamt (1977):
Luftqualitätskriterien für Cadmium.
Berichte 4/77.

UBA, Umweltbundesamt (1981):
BMI-Anhörung zu Cadmium, E1-2.

UBA, Umweltbundesamt (1982):
BMI-Anhörung zu Cadmium, E1-23.

Udom,A.O., Brady,F.O. (1979):
Reactions in vitro of zinc-requiring apoenzymes by rat liver zinc thionein.
Biochem. J. 187, 329-335.

Vander Mallie,R.J., Garvey,J.S. (1979):
Radioimmunoassay of metallothioneins.
J. Biol. Chem. 254, 8416-8421.

Webb,M. (1972 b):
Protection by zinc against cadmium toxicity.
Biochem. Pharmacol. 21, 2767-2771.

Webb,M. (1979):
The chemistry, biochemistry and biology of cadmium.
Elsevier/North Holland, Biomedical Press.

Zelazowsky,A.J., Piotrowsky,J.K. (1977):
The levels of metallothionein-like
proteins in animal tissues.
Experientia 33, 1624-1625.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Toxikologie der Universität Düsseldorf durchgeführt.

Mein Dank gilt Herrn Prof.Dr.med.F.K. Ohnesorge für die Betreuung der Arbeit und die Oberlassung des Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr.med.vet. J. Abel für die Einarbeitung in immunologische Methoden und seine ständige Bereitschaft zu anregenden Gesprächen und Frau H. Osterkamp für die Unterstützung bei meinen Untersuchungen.

Herrn Prof.Dr.med.H.W. Schlipköter danke ich für die Obernahme des Korreferates.

Lebenslauf

23.2.1956	geboren in Caracas (Venezuele) als Sohn des Ingenieurs Manuel Schack und seiner Ehefrau Ingeburg, geborene Butscher.
1962	Einschulung in die Pestalozzi-Schule in Frankenthal/Pfalz.
1963	Umzug nach Paris und Besuch der Deutschen Schule Paris(DSP).
1975	Abitur in der DSP. Eintritt in die medizinische Fakultät an der Universitē Renē Descartes in Paris.
1978	Physikum an der Universitē Renē Descartes. Umzug nach Düsseldorf mit Quereinstieg in das 5. Semester (erster klinischer Abschnitt) der Medizinischen Fakultät Düsseldorf.
1979	Erstes Staatsexamen.
1979-1981	Ableistung der vier Monate Famulatur in der Clinique du Val d'Or in Saint Cloud, in der Praxis des Pädiaters Dr.Gerard Azoulay in Paris und im Liebfrauenkrankenhaus in Düsseldorf.
1981	Zweites Staatsexamen.
1982	Ärztliche Prüfung und Approbation.
1983	Antritt einer Assistenzarztstelle der Medizinischen Klinik des Gerresheimer Krankenhauses, Düsseldorf.
1980-1984	Doktorarbeit bei Prof.Dr.med.F.K.Ohnesorge am Institut für Toxikologie der Universität Düsseldorf.